

BEST AVAILABLE COPY

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-117277

(43)Date of publication of application : 06.05.1997

(51)Int.Cl.

C12M 3/00

C12M 1/22

G02B 21/34

(21)Application number : 08-171242

(71)Applicant : BECTON DICKINSON &amp; CO

(22)Date of filing : 01.07.1996

(72)Inventor : GRUSHKIN-LERNER LESLIE S

(30)Priority

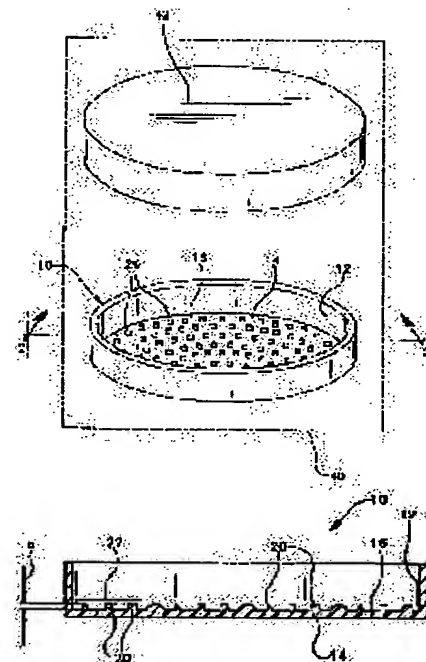
Priority number : 95 496593 Priority date : 29.06.1995 Priority country : US

## (54) CULTURE VESSEL USED WITH GLASS COVER

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a vessel capable of supporting a cover glass above the bottom of the vessel.

**SOLUTION:** This culture vessel 10 for culturing cells has an open receptacle 12 having a bottom face 16. On the bottom face of the receptacle, plural protrusions 20 protruding upward from the bottom face are formed. The protrusions protruding upward are useful for supporting a cover glass 22 above the bottom face of the receptacle and enables cover glass handling considerably easy when taking out the cover glass by substantially inhibiting adhesion caused by effects of surface tension of a medium and cells.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 01.07.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 04.09.1998

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(11)特許出願公開番号

特開平9-117277

(43)公開日 平成9年(1997)5月6日

### 技術表示箇所

A

1/22

G O 2 B 21/34

審査請求 有 請求項の数12 OL (全 7 頁)

(71)出願人 591007332

ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー

BECTION DICKINSON AND COMPANY

アメリカ合衆国ニュージャージー州07417

－1880, フランクリン・レイクス, ワン・  
ベクトン・ドライブ (番地なし)

(72)発明者 レスリー・エス・グルシュキン・ラーナー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01730,  
ベッドフォード, ノートル・ダム・ロード  
21

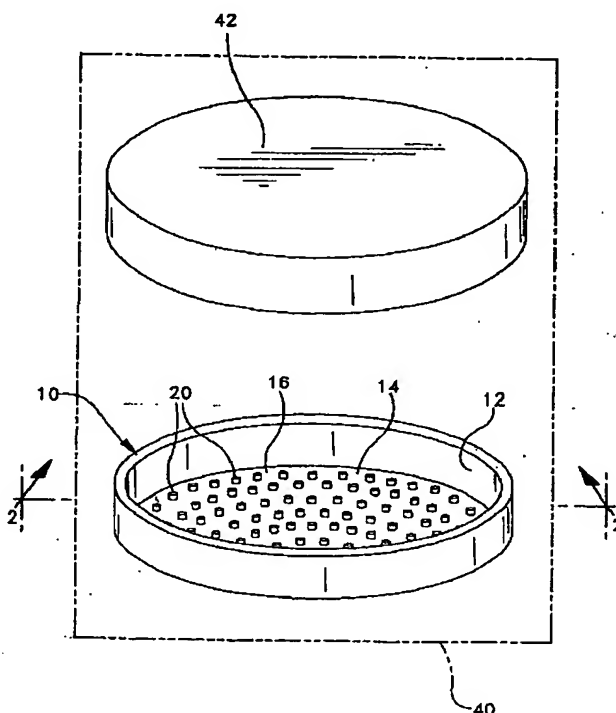
(74)代理人 弁理士 湯淺 恭三 (外6名)

(54) 【発明の名称】 カバーガラスとともに使用するための培養容器

(57) 【要約】

【課題】 カバーガラスを底部の上方に支持する容器を提供する。

【解決手段】 細胞を培養するための本発明の容器 10 は、底面 16 を持つ開放レセプタクル 12 を有する。レセプタクルの底面には、底面から上方に突出した複数の突起 20 が設けられている。上方に突出した突起は、カバーガラス 22 をレセプタクルの底面の上方に支持するのに役立ち、媒体及び細胞の表面張力の効果による付着を実質的に阻止することによって、カバーガラスを取り出す際のカバーガラスの取扱いをかなり容易にする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 底面を有する開口したレセプタクル、及び前記底面から上方に突出した多数の突起を有する、細胞を培養するための容器。

【請求項2】 前記突起は、上方に約1mm乃至約3mm突出しており、前記突起間には約3mm乃至約6mmの隙間があり、カバーガラスを前記容器の前記底部に置くと、カバーガラスが前記底面の上方に前記底面と実質的に平行に支持される、請求項1に記載の容器。

【請求項3】 前記突起は、高さが約1mm乃至約5mmで幅が約0.5mm乃至約1.5mmの実質的に平行な複数のうね状の突起からなり、該うね状の突起は、約3mm乃至約6mmの間隔が隔てられている、請求項1に記載の容器。

【請求項4】 前記突起は、第1方向に配置された複数の実質的に平行なセグメント分けされた第1の突起、及び前記複数の第1の突起と交差する第2方向に配置された複数のセグメント分けされた第2の突起からなり、前記交差した突起は、これによって、多数の十字形状突起を形成する、請求項2に記載の容器。

【請求項5】 内面を持つ実質的に平らな底部を備えたレセプタクルを有し、前記平らな底部の前記内面には、多数の上向きの突起が設けられている、開口容器。

【請求項6】 前記突起は、円錐形、截頭円錐形、円筒形、半球形、及び立方体からなる群から選択された形状を有する、請求項5に記載の容器。

【請求項7】 前記突起は、約0.5mm乃至約1.5mmの実質的に均等な直径を持ち且つ前記底面の上方に約1.5mm乃至約2.5mmの実質的に均等な高さを持つ円筒体からなり、これらの円筒体は、中心から中心まで約4mm乃至約6mmの実質的に均等な間隔で隔てられ、カバーガラスを前記容器の前記底部に置いたとき、カバーガラスが前記底部の上方に前記底部と実質的に平行に支持される、請求項5に記載の容器。

【請求項8】 前記円筒体は、前記底部に対して実質的に垂直な軸線を持つ真円形の円筒体である、請求項7に記載の容器。

【請求項9】 前記容器は、複数のレセプタクルを備えた多ウェルプレートからなる、請求項5に記載の容器。

【請求項10】 蓋を更に有する、請求項5に記載の容器。

【請求項11】 前記突起は、前記底面と一体に形成されており、前記容器は、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、及びポリエステルからなる群から選択された樹脂によって形成されている、請求項5に記載の容器。

【請求項12】 前記容器は、実質的に透明であり、結晶性ポリスチレンから形成されており、微生物を実質的に通さない材料で形成されたパッケージ内に封入されており、内部の微生物を実質的に生存不能にする条件に露

呈してある、請求項5に記載の容器。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞培養装置に関し、更に詳細には、カバーガラスを底部の上方に支持するための手段を備えた培養容器に関する。

【0002】

【従来の技術】 生物学的な研究では、小規模な細胞培養は、多くの場合、顕微鏡のスライドのカバーガラスの表面上で行われる。カバーガラスは、容易に入手でき、容易にきれいにすることができ、且つ均質である。カバーガラスは、一般的には、ガラスやプラスチックでできている。カバーガラスは、直径が12mm、18mmの円形のカバーガラスとして、辺の長さが18mm、22mm、及び25mmの正方形のカバーガラスとして、及び辺の長さが11mm×22mm乃至48mm×60mmの矩形のカバーガラスとして入手できる。細胞培養について使用する場合には、カバーガラスは、全体に清浄であり、蛋白質でコーティングし、乾燥し、平らな底部を持つ培養容器内に置く。こうした手順で使用される培養容器は、一度に何枚かのカバーガラスを互いに間隔を隔てられた状態で置くことができるペトリ皿、或いは各カバーガラスを個々のウェル内に置く多ウェルプレート (multi-well plate) のいずれかである。

【0003】 マサチューセッツ工科大学出版局が1991年に出版した「神経細胞の培養」という標題のバンカー及びゴスリン著の文献には、細胞培養にカバーガラスを使用することが論じられている。この文献では、カバーガラスを使用することが、第255頁乃至第259頁の「海馬の低密度培養を行うためのプロトコル」という論文に記載されている。この「プロトコル」には、プラスチック製の培養皿内で直接成長させた細胞に顕微鏡技術を適用することが困難であると記載されている。「プロトコル」では、蛋白質、ポリリシン、で処理したガラス製のカバーガラスに海馬細胞を塗り付けることによって細胞の付着性を高めるという提案がなされている。

【0004】 「プロトコル」によれば、細胞の単一培養 (mono-culture) を行うため、即ち、一種類の細胞だけを成長させるためには、蛋白質でコーティングしたカバーガラスを容器、一般的にはペトリ皿又は多ウェルプレートのウェル、の底部に平らに置き、細胞を水性媒体に懸濁させた懸濁液を容器に加える。カバーガラス及び懸濁液が入った容器を保温し、実質的に融合した細胞の単一層 (monolayer) をカバーガラス上に発生させる。細胞の顕微鏡分析を行うため、又は細胞に更に処理を加えるため、細胞の単一層を備えたカバーガラスを容器からピンセットで取り出さなければならない。カバーガラス及び容器の底部が実質的に平らであるため、カバーガラスは、多くの場合、水性媒体によって容器の底部に強力に付着してしまう。このように付着してしまうため、ピ

ンセットを用いてカバーガラスを取扱うと、カバーガラスを壊し、細胞を破壊し、場合によっては、カバーガラス上の細胞を無駄にしてしまう。

【0005】共培養 (co-culture) を行う場合、即ち第1の種類の細胞を第2の種類の細胞の直ぐ近くで成長させ、これらの細胞を直接的な接触を伴わずに化学的に相互作用させる場合にも、カバーガラス及び容器を用いた技術を使用できる。「神経細胞の培養」という文献からの「プロトコル」では、カバーガラスを蛋白質でコーティングする前にワックスの小さな液滴をカバーガラスの縁部に付けることが提案されている。この「プロトコル」に従って共培養を行うためには、第1の種類の細胞をカバーガラスのワックスの液滴を付けた側の上で培養し、単一培養手順を実施し、融合した単一層を形成する。カバーガラスのワックスの液滴を付けた側の上で第1の種類の細胞を培養することは、次の工程に必要な取扱い時にカバーガラスを割ってしまう可能性があるために継続して必要である。次いで、第1の種類の細胞が付いたカバーガラスをその元の容器から取り出し、第2の種類の細胞でできた融合した単一層が底面上で培養された第2容器内に、第1の種類の細胞が付いたカバーガラスの側が第2容器内の第2の種類の細胞に向くように置く。カバーガラスを第2容器内に置くことによって、ワックスの液滴が第1の種類の細胞が付いたカバーガラスが第2の種類の細胞の直ぐ近くに支持される。カバーガラスを使用したこの共培養の用途では、ワックスの液滴によりカバーガラスと容器の底部とが離間される。ワックスの液滴があるため、細胞間を直接接触させることなく共培養を進めることができるばかりでなく、カバーガラスが容器の底部に付着されず、カバーガラスを、ピンセットによって、容易に摘み上げて取扱うことができる。

【0006】カバーガラスにワックスの液滴を付けることは、カバーガラスと容器の底部との間を離間するけれども、時間がかかり、技量による出来不出来の差が大きい。更に、ワックスの液滴は潜在的な汚染源であり、取扱い中にとれてしまうことがある。カバーガラスを底部の上方に支持する容器を手に入れることができれば、研究室での細胞の単一培養及び共培養の作業の効率及び有効性が高められる。このような容器を以下に説明する。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、カバーガラスを底部の上方に支持することができる容器を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】細胞を培養するための本発明の容器は、底面を持つ開放レセプタクルを有する。レセプタクルの底面には、底面から上方に突出した多数の突起が設けられている。

【0009】本発明の容器により、細胞の単一培養及び

共培養を行う実験者は、細胞を培養するためにカバーガラスを更に効率的に使用できる。単一培養で使用する場合には、突起がカバーガラスを底部の上方に支持し、カバーガラスの取扱いを容易にし、カバーガラスが容器の底部に付着することによりカバーガラスがこわれてしまうことをかなり少なくする。更に、共培養について使用する場合には、突起は、第1の細胞群を持つカバーガラスを、容器の底の上で成長した第2の細胞群の直ぐ近くに、これらの細胞群間に直接的な接触を伴わずに支持する。この場合、第1の細胞群を備えたカバーガラスは、研究のため、容器から容易に取り出される。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明は、多くの種々の形態で実施できるが、本開示は本発明の原理を説明するためのものであって、本発明の範囲を図示の実施例に限定するものではないという理解の下に、本発明の幾つかの実施例を添付図面に示し且つ以下に説明する。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲及びそれと等価の記載によって限定される。

【0011】図1及び図2を参照すると、本発明の細胞培養容器10は、底部14を備えた開放したレセプタクル12を含む。底部の表面16には、この表面から上方に所定距離「a」だけ突出した多数の突起20が設けられており、これらの突起は、距離「b」だけ間隔を隔てられている。好ましくは、表面16は実質的に平らであり、突起20の突出距離「a」は好ましくは実質的に均等であり、そのため、カバーガラス22を図3、図4、及び図5に示すようにレセプタクル12の底部に置いたとき、カバーガラスは底面16と実質的に平行に支持される。

【0012】図3に概略に示すように、突起20は、円錐形、截頭円錐形、円筒形、半球形、立方形を含むがこれらに限定されない種々の幾何学的形状を持つことができる。変形例では、図4に示すように、突起20は、間に間隔「b」を置いた実質的に平行なうね状の突起24からなるのがよい。突起がうね状である場合には、寸法「b」は、好ましくは、約3mm乃至約6mmであり、これらの突起の高さは約1mm乃至約5mmであり、幅が約0.5mm乃至約1.5mmである。特定の用途についての更に高い突起、広幅の突起、又は間隔の異なる突起は、本発明の範囲内にあるものと考えられる。

【0013】第5図を参照すると、突起20は、複数の実質的に平行なセグメント分けされた第1突起28及びこれと交差する複数の実質的に平行なセグメント分けされた第2突起30によって形成された十字形26の形状であるのがよい。他の形体も本発明の範疇に入る。例えば、突起は、レセプタクルの底部に形成された、開放セグメントを備えた又は備えていない間隔が隔てられた一連の同心のリングであるのがよい。好ましくは、図1及び図2に示すように、突起20は真円形の円筒体であ

り、約0.5mm乃至約1.5mmのほぼ均等な直径「c」を持ち、表面16の上方に約1.5mm乃至約2.5mmのほぼ均等な高さ「a」を持ち、中心から中心まで約4mm乃至約6mmのほぼ均等な間隔「b」を持つ。用途によっては、突起の高さ「a」は約1mm乃至5mm又はそれ以上の範囲であるのがよく、間隔「b」は3mm乃至6mmであるのがよく、それ以上であってもよい。好ましい円筒形突起20の軸線「x」は、底面16に対して実質的に垂直である。

【0014】本発明の容器をカバーガラスとともに使用したところを図3、図4、及び図5に示す。カバーガラスは、一般的にはガラス製であり、約0.09mm乃至約0.23mmの範囲の厚さのものを商業的に入手できる。カバーガラスは、一般的には、直径が12mm、18mm、22mm、及び25mmの円形のカバーガラスとして、辺の長さが18mm、22mm、及び25mmの正方形のカバーガラスとして、及び辺の長さが11mm×22mm乃至48mm×60mmの矩形のカバーガラスとして製造される。図3は、突起20上の所定位置に置いた幾つかの形状のカバーガラス22の断面を示す。突起20は、カバーガラス22を底面16と実質的に平行に支持する。図4は、カバーガラスが突起上に支持されている場合の、ピンセットを使用したカバーガラス22の取扱いを示す。図5に示すように、本発明の容器は、種々の形状及び大きさのカバーガラスとともに使用できる。容器及び選択されたカバーガラスの大きさに応じて、レセプタクルは一つ又はそれ以上のカバーガラスを収容できる。

【0015】多くの細胞は、蛋白質でコーティングした清浄なガラス表面上に融合した単一層を形成する。ガラス製のカバーガラスはどこからでも入手でき、極めて均質である。細胞の単一培養を行うため、清浄なガラス製カバーガラスを蛋白質、多くの場合はポリリシン、でコーティングし、乾燥させ、研究室用培養容器、多くの場合は、一般的に「ペトリ」皿と呼ばれる平らな底部を備えた真っ直ぐな側壁を持つ平らな円形の開放した皿に置く。次いで、細胞を適当な水性の媒体に懸濁させた懸濁液を皿に導入する。次いで、カバーガラス上に融合した細胞層が形成されるまで、懸濁液が入った皿を保温する。次いで、カバーガラスを容器から、一般的にはピンセットで取り出し、所望の分析を行う。カバーガラス及び容器の底面が両方とも実質的に平らであるため、カバーガラスと底面との間の水性媒体の表面張力の作用により、カバーガラスを表面から持ち上げるのが極めて困難である。多くの場合、ピンセットでの取扱い時に、融合した細胞層が破れるか或いはカバーガラスが壊れてしまう。

【0016】本発明の好ましい容器10を使用して同様の単一培養を行う場合には、好ましい突起20がカバーガラス22をレセプタクルの底部の上方にこれと実質的に平行に支持する。図3、図4、及び図5を参照する

と、蛋白質でコーティングしたカバーガラス22を容器10のレセプタクル12に置き、媒体に細胞を懸濁させた懸濁液を上文中に説明した手順と同様の方法で加える。オペレータがカバーガラス22を図4に示すようにピンセットで取り除くとき、突起20がカバーガラス22を底面16の上方に底面16と実質的に平行に支持するため、カバーガラス22とレセプタクルの底面16とが付着することが実質的になく、かくして、分析を行うためにカバーガラスを容易に取り外すことができる。

【0017】上文中に引用した、マサチューセッツ工科大学出版局が1991年に出版した「神経細胞の培養」という標題のバンカー及びゴスリン著の文献に記載された共培養の例では、引用したプロトコルは、グリア細胞が存在した状態で海馬の神経細胞をカバーガラス及び培養容器を使用して培養するための方法を提供する。引用したプロトコルには、カバーガラスにワックスのビーズを付けてカバーガラスを容器の表面の上方に支持することが記載されている。本発明の容器10を使用して同様の共培養を行うためには、オペレータは、カバーガラス22をプロトコルで行われているようにポリリシンでコーティングするが、突起20がカバーガラス22をレセプタクルの表面16の上方に支持するため、カバーガラスにワックスのビーズを付ける必要がない。グリア細胞が存在した状態での神経細胞の共培養では、オペレータは、融合したグリア細胞層を、突起20を備えたレセプタクル10の底面16上に形成する。これと同時に、単一培養について上文中に説明したように、神経細胞をカバーガラスの表面上で培養し、次いで、一方の面上に神経細胞が付いたカバーガラスを、グリア細胞が底面上にある容器に移し、神経細胞で覆われた面を容器の底のグリア細胞の融合層に向けて置く。次いで、適当な媒体を加え、容器を保温する。好ましい突起20は、神経細胞で覆われたカバーガラスを、レセプタクルの底面の上方にこの底面と実質的に平行に、グリア細胞の直ぐ近くであるがカバーガラスの神経細胞とレセプタクルの底面のグリア細胞との間に直接的な接触がないように支持する。かくして、本発明の容器10を使用することによって、オペレータは、細胞培養操作技術又は細胞の分析に集中でき、ワックスの液滴をカバーガラスに付ける技術を開発したりこれを実行するのに時間を費やすことがなく、細胞を実際に共培養するのに必要な時間を短縮し、研究所の効率を上げる。

【0018】突起20は円筒形状であるのが好ましい。これは、この形状が、細胞の単一層が突起を覆う傾向を最小にするためである。半球形状は、融合した細胞層で覆われる傾向がある。好ましくは、突起20は、レセプタクルの表面16と一体に形成されている。容器10は、円形、正方形、矩形、又は特定の用途で所望の任意の他の形状とすることができる。この説明では、簡略化を図るため、図1、図2、図4、及び図5には、ペ

トリ皿の形態の容器 10 が示してある。他の形状も本発明の範囲内にある。

【0019】本発明の容器 10 は、研究所の培養容器で通常使用される任意の大きさに形成されているのがよい。容器は、カバーを備えた又は備えていない状態で供給される。更に、容器 10 の形状と、レセプタクル 12 の形状が異なってもよい。容器は、ガラス、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリエステル、等から形成できる。好ましくは、容器 10 は、実質的に透明であるように、結晶性ポリスチレンによって形成される。突起は、容器の成形に使用されたのと同じ材料で底面上に一体に形成されているのが好ましい。

【0020】好ましくは、容器 10 は、図 1 に参照番号 40 を付した仮想線で示すパッケージ内に封入されているのがよい。このパッケージは、微生物を実質的に通さない材料で形成されており、パッケージ内の微生物を生存不能にできる条件に露呈してある。容器 10 は、好ましくは、カバー 42 とともにパッケージ 40 に入れて供給される。パッケージの適当な材料には、紙、不織布、及びポリマーフィルムが含まれるがこれらに限定されない。微生物を生存不能にするための適当な処理には、酸化エチレンに露呈すること、電離線に露呈することが含まれる。引用文献に記載されたプロトコルでは、ワックスの液滴を付けるのに必要な取扱い中にカバーガラスが汚染される可能性があるため、ワックスの液滴を付けた後に再度殺菌を行う。本発明の容器 10 は、カバーガラスを再度殺菌する必要がない。好ましい容器 10 が殺菌状態でパッケージに入れて供給される場合には、オペレータは、パッケージ 40 から容器 10 を取り出すだけで、所望の細胞培養を始めることができる。

【0021】本発明の変形例を図 6 に示す。この実施例では、容器のレセプタクルの構造が図 1 乃至図 5 に示す容器と実質的に同じである。この実施例では、複数の円形のレセプタクル 12 が矩形の多ウエルプレート 50 に組み込んだりである。特定の用途について、多ウエルプレ-

ートに組み込んだレセプタクルの数は、2 乃至 100 又は 100 以上である。図 6 では、プレート 50 は四つのレセプタクル 12 を有する。参考のため、カバーガラスが一つのレセプタクルに置いてある。

【0022】本発明の容器により、細胞の単一培養及び共培養を行う実験者は、細胞培養用カバーガラスを更に効率的に使用できる。単一培養で使用する場合、カバーガラスが突起によって底面の上に支持されているため、カバーガラスを容易に取扱うことができ、カバーガラスが容器の底に付着するためにカバーガラスが壊れてしまうことが実質的になくなる。更に、共培養について使用する場合には、第 1 の細胞群を持つカバーガラスを、突起が、容器の底の上で成長した第 2 の細胞群の近くに、これらの細胞群間に直接的な接触を伴わずに支持する。この場合、第 1 の細胞群を備えたカバーガラスは、研究のため、容器から容易に取り出すことができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の容器の分解斜視図である。

【図 2】図 1 の容器の 2-2 線に沿った断面図である。

【図 3】突起の幾つかの形状を示す図 1 の容器と同様の容器の、図 2 と同様の概略断面図である。

【図 4】カバーガラスの取扱いを示す図 1 の容器の一実施例の斜視図である。

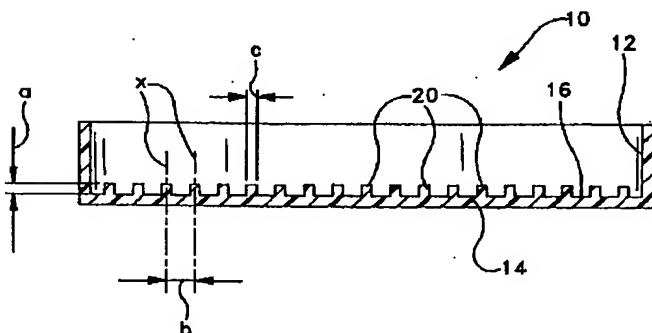
【図 5】幾つかのカバーガラスの配置を示す図 1 の容器の一実施例の平面図である。

【図 6】図 1 に示す複数の容器を多ウエルプレートに組み込んだ本発明の一実施例の斜視図である。

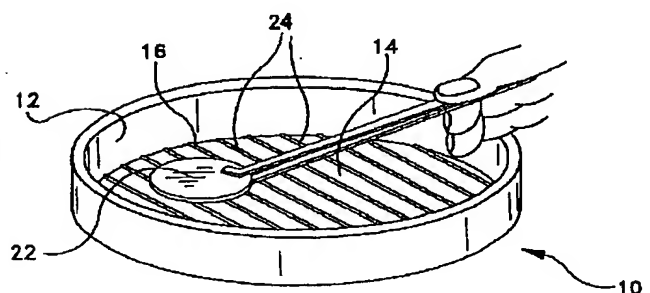
【符号の説明】

10	細胞培養容器	12	レセプタクル
14	底部	16	底面
20	突起	22	カバーガラス

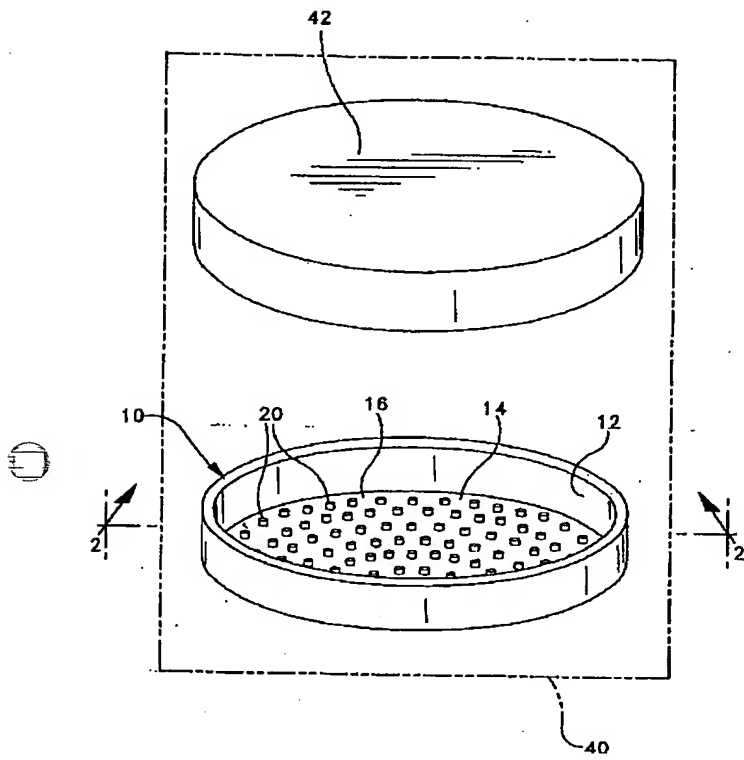
【図 2】



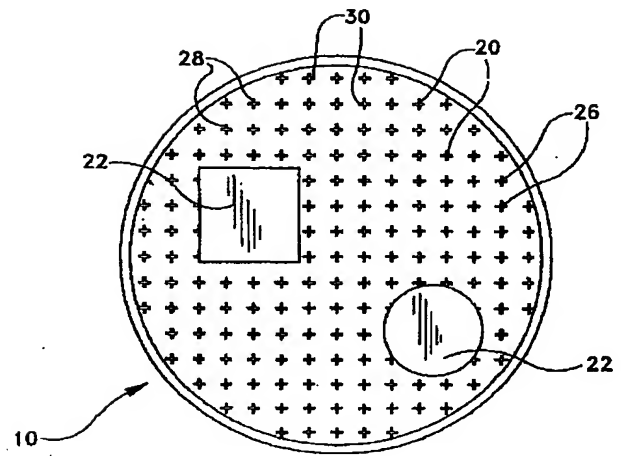
【図 4】



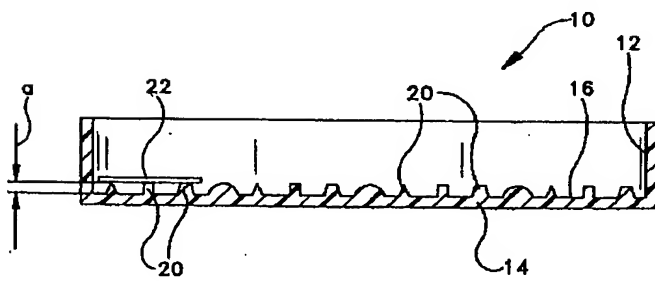
【図 1】



【図 5】



【図 3】

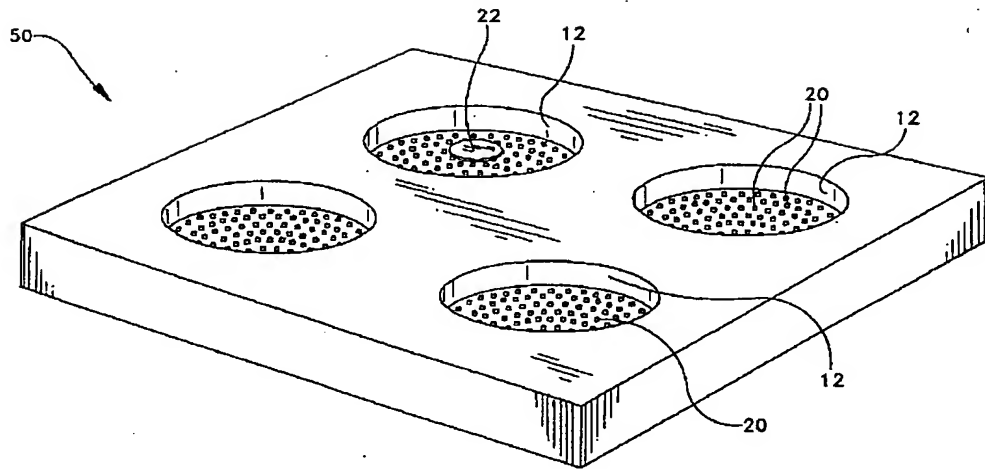




(7)

特開平9-117277

【図6】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**